

## Innovatív technológiájú ciprofloxacín-hidroklorid tartalmú száraz porinhalációs rendszer fejlesztése

BENKE EDIT, SZABÓNÉ RÉVÉSZ PIROSKA, AMBRUS RITA\*

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet,  
Szeged, Eötvös u. 6. -6720

\*e-mail: arita@pharm.u-szeged.hu

### Summary

E. BENKE, P. SZABÓNÉ RÉVÉSZ, R. AMBRUS.: **Development of ciprofloxacin hydrochloride containing dry powder inhalation system with an innovative technology**

**Introduction:** There are different types of dry powder inhalation systems (DPIs) called traditional (carrier-based) and new generation (carrier-free) formulations which are used throughout industrial production and development works. However application of newer formulations could offer new development trend in this field.

**Aim:** The aim of the experimental work was the development of an innovative technology (application of spray-dried drug on the modified surface of carrier) to reach DPI containing antibiotic (ciprofloxacin hydrochloride) with the advantageous properties of carrier-based and carrier-free systems, therefore resulted high lung deposition.

**Method:** Interactive physical mixtures were prepared by controlled conditions using lactose for inhalation, raw and spray-dried ciprofloxacin hydrochloride. Surface modification by magnesium stearate was also applied. The prepared samples were characterized by physico-chemical and dosage-form investigations.

**Results:** The surface modification and the applied innovative technology resulted high lung deposition. Investigation of interparticulate interaction a correlation between the physico-chemical properties and lung deposition results of DPIs.

**Conclusion:** According to our results it could be concluded, that there is *raison d'être* of application. The prepared samples presented nearly the same lung deposition (~70%) like the new generation DPIs.

**Keywords:** DPI, combined formulation, interparticulate interactions, surface modification of carrier, ciprofloxacin hydrochloride

### Összefoglalás

**Bevezetés:** Jelenleg a száraz porinhalációs rendszerek (DPI, dry powder inhaler) esetén hordozó alapú és új generációs (hordozómentes) rendszereket állítanak elő gyári, illetve kísérleti fázis szintjén is. Érdemes megvizsgálni más formulációk, összetételek megvalósíthatóságát, új fejlesztési irányvonalat indítva ezen a területen.

**Célkitűzés:** Az experimentális munka célja olyan innovatív formulálású, antibiotikum (ciprofloxacín-hidroklorid) tartalmú DPI készítmény fejlesztése (porlasztva szárított hatóanyag alkalmazása hordozó felületén), amely magába ötvözi a klasszikus hordozó alapú és az új generációs DPI rendszerek előnyös tulajdonságait, kiemelkedő tüdődepozíciót eredményezve. További célunk összefüggések keresése az előállított termékekben fellépő interpartikuláris kölcsönhatások és a tüdődepozíciós eredmények között.

**Módszerek:** Kontrollált körülmények között interaktív fizikai keverékeket állítottunk elő inhalációs laktóz, valamint kezeletlen és porlasztva-szárított ciprofloxacín-hidroklorid esetében is. Magnézium-sztearáttal felületmódosított hordozót tartalmazó termékeket egyaránt készítettünk. A mintákat fizikai-kémiai vizsgálatokkal és gyógyszerforma-vizsgálattal jellemeztük.

**Eredmények:** Innovatív formulálás alkalmazásával legfőképp a felületmódosított terméknel sikerült figyelemre méltó tüdődepozíciós eredményt elérnünk. Interpartikuláris kölcsönhatások vizsgálata révén összefüggést találtunk az interaktív fizikai keverékek fizikai-kémiai tulajdonságai és tüdődepozíciós eredményei között.

**Következtetések:** Az eredmények alapján megállapítható, hogy a innovatív formulálású DPI készítmények fejlesztésének van létjogosultsága. Az előállított mintáink figyelemre méltó tüdődepozíciós eredményei (~70%) felveszik a versenyt az új generációs DPI készítményekével.

**Kulcsszavak:** száraz porinhalációs rendszerek, innovatív formulálású DPI, interpartikuláris kölcsönhatások, hordozó felületmódosítása, ciprofloxacín-hidroklorid

### 1. Bevezetés, az experimentális munka célkitűzése

Formulálásuk tekintetében a DPI készítmények hagyományos hordozó alapú, valamint hordozómentes (új generációs) rendszerek lehetnek. A forgalomban – egy-két kivételtől eltekintve – a hagyományos formulálású készítmények találhatók

meg. A nagyméretű hordozók felhasználása előnyös olyan hatóanyagoknál, amelyek erős kohezív sajátságokkal bírnak, pozitívan befolyásolja a termék folyási tulajdonságait, kis mennyiségű hatóanyag dozírozhatósága pontosítható, illetve az inhaláció során a szájüregben deponálódott hordozó íze megerősíti a betegben a termék sikeres használatának tényét. Viszont az ilyen formulálású termékek (gyári készítmények) többsége

még alacsony tüdődepozíciós értékekkel rendelkezik (~20-30 %-os FPF, finom részecske frakciós érték), tehát a hatóanyag kis százaléokban éri csak el a tüdő megfelelő szegmenseit, mert a nagyméretű hordozón maradt jelentős mennyiségű farmakon a felső légutakban kitapad. A hagyományos száraz porinhalációs rendszerek esetén fellépő interpartikuláris kölcsönhatásokkal kevés tanulmány foglalkozik nemzetközi szinten is, pedig ezek alapvető befolyással rendelkeznek a készítmények pulmonális depozíciójára vonatkozóan [1].

Az új generációs DPI rendszerek tekintetében *megfelelő segédanyagok és technológiai megoldások* – elsősorban porlasztva szárítás – alkalmazásával a nagyméretű hordozók felhasználása kiküszöbölhetővé vált. Viszont, ezen rendszerek is csak hozzávetőleg 50-60%-os FPF eredményekkel rendelkeznek, a hatóanyag szemcsék között kialakuló, kimutathatóan magas kohezív sajátságok miatt [1-3].

Az antibiotikumok alkalmazása tüdőfibrózis kezelésében már régre visszanyúlik, ugyanis az Abbot Laboratories már 1948-ban kifejlesztette a penicillin por tartalmú inhalációs aerohalert. A bakteriális légúti fertőzések leggyakoribb kezelési módját jelenleg is az egyszeri vagy kombinált antibiotikumok nagy dózisainak orális beadása jelenti, amelyek súlyos mellékhatásokkal járhatnak. Az antibiotikum tartalmú DPI rendszerek fejlesztésével ezen betegségek lokális kezelése válik lehetővé. Így a tüdőszövetben magas hatóanyag-koncentráció érhető el, kisebb dózisok alkalmazása elegendő az orális terápiához képest, csökkent szisztémás antibiotikum expozícióval és alacsonyabb toxicitási kockázattal is számolhatunk [4].

Munkánk célja olyan innovatív formulálású, antibiotikum tartalmú DPI készítmény fejlesztése (porlasztva szárított hatóanyag alkalmazása hordozó felületén), amely magába ötvözi a klasszikus hordozó alapú és az új generációs DPI rendszerek előnyös tulajdonságait, kiemelkedő tüdődepozíciós eredményt mutatva. Ezáltal innovatív formulálású DPI rendszer előállítását terveztük ciprofloxacin-hidroklorid felhasználásával, magas tüdődepozíciós eredmények elérése érdekében. Továbbá azonos előállítási paraméterek mellett mikronizált ciprofloxacin-hidroklorid alkalmazásával referencia minták előállítását végeztük a vizsgálati eredmények megfelelő kiértékelhetősége szempontjából. Célunk a fentebb említett forgalomban levő DPI-k FPF értékeinek meghaladása és összefüggések keresése az előállított termékekben fellépő interpartikuláris kölcsönhatások és a tüdődepozíciós eredmények között.

## 2. Alkalmazott anyagok

Az experimentális munka során *ciprofloxacin-hidroklorid* (Cip-HCl) (Teva Gyógyszergyár Zrt., Debrecen, Magyarország) tartalmú összetételeket állítottunk elő pulmonális gyógyszerbevitel céljából. A Cip-HCl hatástanilag a fluorokinolinok csoportjába tartozó antibiotikum. Hatását a DNS giráz enzim és a topoizomeráz IV gátlásával éri el. Hatásos Gram pozitív baktériumok, pl. *Staphylococcus*, *Bacillus* fajok és a legtöbb Gram negatív mikroorganizmus, pl. *Pseudomonas* fajok ellen is. Kutatócsoportunkban, illetve nemzetközi szinten is fejlesztés alatt állnak ciprofloxacin alapú DPI készítmények cisztás fibrózisban szenvedő betegek krónikus tüdőfertőzésének kezelésére [4, 5].

Nagyméretű hordozóként  $\alpha$ -laktóz-monohidrátot alkalmaztunk. Gyári készítmények vonatkozásában – egy-két kivételtől eltekintve – csak laktóz felhasználásával előállított hordozó alapú forgalmazott készítményekkel találkozhatunk [1]. Felhasználhatóságát alátámasztotta, hogy orális készítmények segédanyagaként már régóta használt, tehát biztonságos és megfelelő stabilitási profillal rendelkezik. A legnagyobb százaléokban a szájjüregben és a torokban deponálódik nagy mérete révén. A nyálban jelenlevő bakteriális enzimek által hidrolizálódik vagy lenyelés esetén a bél enzimei metabolizálják. A tüdőbe lejutott laktóz szemcsék gyorsan felszívódnak, majd metabolizálódnak, végül a vizelettel ürülnek [6]. Az általunk felhasznált Inhalac® 70 (IH 70) (MEGGLE Group, Wasserburg, Németország) magas minőségű, megfelelő mikrobiológiai tisztaságú kritályos laktóz, amely kifejezetten DPI-ok segédanyagaként használatos [7].

A nagyméretű hordozó felületének kezeléséhez *magnézium-sztearátot* (MgSt) (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) vettünk igénybe. Szilárd gyógyszerformák esetében (pl. tabletták) lubrikánsként/kenőanyagként;/ glidánsként és antiadhezív tulajdonsága révén széles körben alkalmazott segédanyag. Tanulmányok bebizonyították, hogy száraz porinhalációs készítményekben is van segédanyagként létjogosultsága. Hordozó alapú DPI termékekben hozzájárul a por áramlásának javulásához, az interpartikuláris kölcsönhatásokat kedvezően befolyásolja, illetve elősegíti a farmakon szemcsék felszabadulását és diszperzióját a nagyméretű hordozó felületéről. Továbbá az is bebizonyosodott, hogy magas páratartalom esetén javítja a DPI készítmény nedvességgel szembeni ellenállását [8]. A tüdő mélyebb szegmenseibe csak jelentéktelen mennyiségű magné-



zium-sztearát jut le, amely nem jár negatív hatásokkal [9]. A fentebb említett kedvező tulajdonságai révén a magnézium-sztearát felhasználását segédanyagként jóváhagyták inhalációs terápiában való alkalmazásra [10]. A Magyarországon forgalmazott DPI-ok közül az *Anoro*<sup>®</sup> (Glaxo Group Ltd.), a *Foster*<sup>®</sup> *Nexthaler*<sup>®</sup> (Chiesi Pharmaceuticals GmbH), az *Incruse*<sup>®</sup> (Glaxo Group Ltd.), a *Relvar*<sup>®</sup> *Ellipta*<sup>®</sup> (Glaxo Group Ltd.), a *Seebri*<sup>®</sup> *Breezhaler*<sup>®</sup> (Novartis Europharm Ltd.) és az *Ultibro*<sup>®</sup> *Breezhaler*<sup>®</sup> (Novartis Europharm Ltd.) inhalációs porok tartalmazznak magnézium-sztearátot [11]. A megnevezett készítményeket mind az utóbbi öt évben engedélyezték [12].

### 3. Minták előállítása

#### Porlasztva szárítás

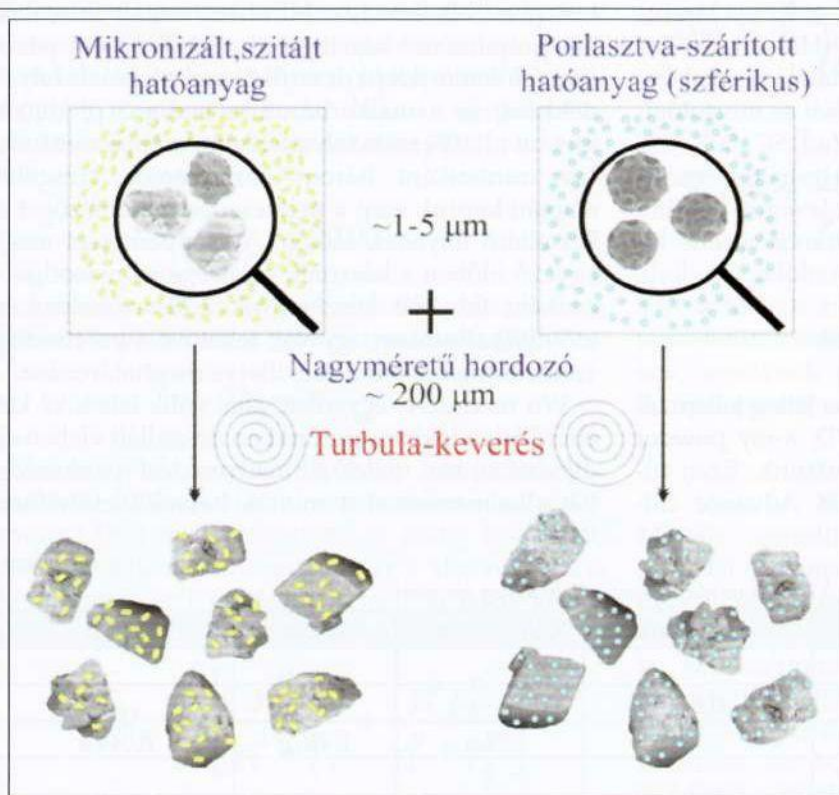
A porlasztva szárítás – mint hatóanyag mikronizálási módszer – DPI rendszerek előállítása során széles körben alkalmazott technológiai eljárás. Alkalmazásával javulnak a részecskék aerodinamikai tulajdonságai, pl. alacsonyabb sűrűség, porózusabb szerkezet, megváltozott morfológia jellemzi őket, a kiindulási szemcsékhez képest [13].

Újszerű formulálás kivitelezéséhez (porlasztva szárított hatóanyag alkalmazása nagyméretű hordozó felületén) először a ciprofloxacín-hidroklorid, mint vízdoldékony só porlasztva szárítására volt szükség. Az adott hatóanyag 0,50 g-ját 89,5 g desztillált víz és 10,0 g 96%-os etanol elegyében oldottunk, ezáltal szem előtt tartva, hogy az etanol előnyösen befolyásolja a termékek aerodinamikáját. A porlasztva szárítás során fűvókás (pneumatikus) porlasztva szárító berendezést (Büchi Mini Spray Dryer B-191) vettünk igénybe. Kutatócsoportunk korábbi kutatási eredményei alapján az alábbi főbb beállítási paramétereket alkalmaztuk a porlasztva szárítás megvalósítására: a szárító levegő beállított hőmérséklete ( $T_{in}$ ) 140 °C. A kimenő hőmérséklet ( $T_{out}$ ) 78 °C, ami a ciprofloxacín-hidroklorid olvadáspontja alatt van. A szárító levegő áramlásának erőssége (Asp.) 75%, a mintaadagoló pumpa fordulatszáma (Pump.) 005%, a sűrített levegő áramlási sebessége (Air flow) 600 l/óra. Ezen paraméterek befolyásoló hatással bírnak a porlasztás során kialakuló részecskék méretére, morfológiájára, a szemcseméret eloszlására, a szemcsék porozitására és nedvességtartalmára is.

#### Turbula-keverés

Turbula-keverő alkalmazásával alakítottuk ki a nagyméretű hordozóból (IH 70) és a porlasztva-szárított hatóanyagból (Cip-HCl-spd) álló innovatív formulálásnak számító interaktív fizikai keveréket. Előállítottuk az említett formuláció olyan változatát is, ahol a hordozót előzetesen magnézium-sztearáttal (MgSt) felületkezeljük. A megfelelő szemcseméret (mikronizált) alkalmazása céljából szitált (25 mikrométer fonalközi távolság), kristályos ciprofloxacín-hidroklorid (Cip. HCl-szitált) felhasználásával pedig azonos előállítási paraméterek használatával készítettünk a kiértékelés során referenciaként alkalmazott mintákat (1. ábra).

A termékek előállítási paramétereit irodalmi adatok alapján definiáltuk, így a hordozó-hatóanyag tömegarány



1. ábra: A gyári hagyományos előállításnak megfelelő (bal) és módosított habitusú (jobb) hatóanyag DPI formulálása



minden esetben 10 az 1-hez [14] volt. A hordozó előzetes felületkezelése 4 órás Turbula-keveréssel [15] történt a termékre vonatkoztatott 2% *m/m* magnézium-sztearát [16] alkalmazásával. A hatóanyag tartalmú interaktív fizikai keverékek előállítására fél óra turbulázást igényelt [17]. Az *I. táblázatban* kerülnek feltüntetésre a kísérletek során vizsgált mintáink összetételei.

#### 4. Vizsgálati módszerek

##### *Részecske méret, morfológia*

Malvern Mastersizer 2000 Scirocco (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) berendezéssel vizsgáltuk a felhasznált ható- és segédanyagok, illetve a porlasztva szárított hatóanyag szemcseméretét. Porok mérése révén száraz feltétet alkalmaztunk. A készülék a porokat (megközelítőleg 0,5 g tömegű mintákat) a levegőben aeroszollá alakítja 2,0 bar nyomáson. Az elvégzett szemcseméret meghatározást követően megszerkeszthető a szemcseméret-megoszlási görbe és a granulometriai (összeggörbe) is. A minták jellemző paraméterei a fentebb említett görbék alapján megadhatók, azaz  $D[0.1]$ ,  $D[0.5]$ ,  $D[0.9]$  az a méret ( $\mu\text{m}$ ), amelynél a részecskék 10%-a, 50%-a, 90%-a kisebb.

Pásztázó elektronmikroszkóp (Hitachi S-4700, Hitachi Scientific Ltd., Japán) alkalmazásával határoztuk meg a részecskék habitusát és morfológiáját. Arany-palládiummal (Bio-Rad SC 502, VG Microtech, Anglia) vontuk be a vizsgált szemcséket, majd 1,3–13 mPa nyomású levegőt vettünk igénybe, a minták felületén elektromos vezetés kialakítása céljából.

##### *Szerkezeti vizsgálatok*

A fizikai sajátságok és a kristályos jelleg jellemzésére porröntgen diffrakciós (XRPD, X-ray powder diffraction) vizsgálatokat alkalmaztunk. Ezen tulajdonságok mérésére Bruker D8 Advance dif-

fraktométert (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Németország) használtunk. A sugárforrás: Cu K $\alpha$ 1 sugárzás ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ). Egységesen 40 kV feszültségen és 15 mA áramerősségen történt a beolvasás 3°-tól 40°-ig ( $2\theta$ ), a szkennelési sebesség 0,1°/min, lépésköz pedig 0,01°. A röntgen kalibrálását szilícium koronggal végeztük. Eredményeink kiértékelésére DIFFRACT plus EVA szoftvert használtunk. A diffraktogramokat K $\alpha$ 2-vel korrigáltuk, simítottuk és alapvonal-korrekció elvégzése után értékeltük.

A termoanalitikai méréseket Mettler Toledo STAR<sup>®</sup> készülék (Mettler Inc., Schwerzenbach, Svájc) segítségével végeztük. A differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) méréseket argon gáz áramoltatásával (10 l/óra), 2–4 mg-os mintával 25–350 °C között, 10 °C/perc fűtési sebességgel hajtottuk végre.

##### *Nedvesedési peremszög meghatározása és a belőle számolt összefüggések*

A nedvesedési peremszög meghatározását OCA cseppkontúr analizáló készülékkel (Dataphysics OCA 20, Dataphysics Instruments GmbH, Németország) végeztük. Alapanyagok és termékek esetén is 0,10 g-ot kimérve pasztillát préseltünk 1 tonna préserővel, Specac (Specac Inc., USA) hidraulikus prést alkalmazva. Minden vizsgált mintából hat préselményt készítettünk. Ebből három pasztilla felületére 4,8  $\mu\text{l}$  desztillált vizet (poláris folyadékként) és a másik háromra pedig 2  $\mu\text{l}$  dijudmetánt (diszperziós folyadékként) cseppentettünk. Így mintánként három párhuzamos vizsgálat alapján kaptuk meg a nedvesedési peremszöget a két eltérő folyadék esetén. A cseppentéssel megegyező időben a készülék segítségével másodpercenként felvettelt készítettünk 1–25 másodperces időintervallumban, így vált lehetővé a peremszög változásának detektálása, illetve meghatározása.

Wu módszere, egyenlete által válik lehetővé két eltérő folyadékban, esetünkben desztillált vízben és dijudmetánban detektált nedvesedési peremszög ( $\theta$ ) alkalmazásával a minták határfelületi/felületi

*I. táblázat*

Vizsgált mintáink összetétele tömeg alapján

Minták	Cip-HCl-szitált	Cip-HCl-spd	IH 70	MgSt
Cip-HCl-szitált	X	-	-	-
Cip-HCl-szitált+IH70	0,2 g	-	2,0 g	-
Cip-HCl-szitált+(IH70+MgSt)	-	0,2 g	1,956 g	0,044 g
Cip-HCl-spd	-	X	-	-
Cip-HCl-spd+IH70	-	0,2 g	2,0 g	-
Cip-HCl-spd+(IH70+MgSt)	-	0,2 g	1,956 g	0,044 g



szabadenergiájának ( $\gamma_s$ ) kiszámolása. Az anyag felületi szabadenergiája ( $\gamma_s$ ) definíció szerint az a szabadenergia változás, amely a felület egy egységnyi növelésekor bekövetkezik. Ez két részből tevődik össze: egy diszperziós részből ( $\gamma_s^d$ ) és egy poláris részből ( $\gamma_s^p$ ), ezáltal ( $\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$ ). A folyadékok felületi feszültsége ( $\gamma_l = \gamma_l^d + \gamma_l^p$ ). Irodalmi adatok alapján ismert, desztillált víz esetében  $\gamma_l^d = 21,8$  mN/m,  $\gamma_l^p = 51,0$  mN/m, így  $\gamma_l = 72,8$  mN/m. Dijódmétán vonatkozásában  $\gamma_l^d = 50,8$  mN/m,  $\gamma_l^p = 0$  mN/m, ezáltal  $\gamma_l = 50,8$  mN/m. A Wu egyenletben ennek következtében már csak két ismeretlen marad: a vizsgált szilárd anyag diszperziós  $\gamma_s^d$  illetve poláris komponense ( $\gamma_s^p$ ). Ezek kifejezhetőek két egyenletből, azaz a Wu egyenletbe behelyettesítjük a desztillált vízben mért peremszög értéket és a desztillált víz irodalmi adatait, a másik egyenletbe pedig ugyanezt elvégezve a dijódmétán esetén [18-20].

Wu egyenlete a következő [18]:

$$(1 + \cos \Theta) \gamma_l = \frac{4(\gamma_s^d \gamma_l^d)}{\gamma_s^d + \gamma_l^d} + \frac{4(\gamma_s^p \gamma_l^p)}{\gamma_s^p + \gamma_l^p}$$

ahol  $\Theta$  = a nedvesedési peremszög;  $\gamma$  = határfelületi feszültség;  $s$  = szilárd fázis;  $l$  = folyékony fázis;  $d$  = diszperziós komponens;  $p$  = poláris komponens

A felületi szabadenergia ( $\gamma_s$ ) és a poláris komponens ( $\gamma_s^p$ ) ismeretében kiszámolható a minták polaritása az alábbi összefüggés szerint [20]:

$$(\gamma_s^p / \gamma_s) \cdot 100$$

A kohéziós munka ( $W_c$ ) egyszerűen számolható a felületi szabadenergia ( $\gamma_s$ ) kétszereseként [20]:

$$W_c = 2 \cdot (\gamma_s)$$

A két különböző anyag (képletben 1-es és 2-es számokkal jelölve) között értelmezhető adhéziós munka ( $W_a$ ) meghatározható az eddig kiszámolt, anyagra jellemző diszperziós ( $\gamma_s^d$ ), illetve poláris komponens ( $\gamma_s^p$ ) értékekből, melyek jelen képlet esetén  $\gamma^p$ -nek, illetve  $\gamma^d$ -nek felelnek meg [20].

$$W_a = 4 \left[ \frac{\gamma_1^d \gamma_2^d}{\gamma_1^d + \gamma_2^d} + \frac{\gamma_1^p \gamma_2^p}{\gamma_1^p + \gamma_2^p} \right]$$

Az adhéziós erő ( $F_{adh}$ ) meghatározására több modell is ismeretes, jelen munkánk során a

Derjaguin-féle megközelítést vettük igénybe, mely a gyógyszer technológiában rendszerint alkalmazott [18]:

$$F_{adh} = 2\pi \left( \frac{R_A R_B}{R_A + R_B} \right) W_{adh}$$

ahol  $R_A$  és  $R_B$  az A és B részecske sugara, melyek közötti adhéziós kölcsönhatást vizsgáljuk.  $R$  méretét felhasznált alapanyagonként a szemcseméret-analízis során meghatározott  $D[0.5]$  érték feleként határoztuk meg.

A szétterülési együttható ( $S_{12}$ ) azt mutatja meg, hogy az egyik anyag (1) a másik anyag felületén (2) mekkora valószínűséggel terül szét. Fordított esetben is kiszámolható. Kétkomponensű rendszerek során az eloszlás jellemzésére szolgál. Ez egy dimenzió nélküli szám. Energetikailag kedvező a szétterülés, amennyiben pozitív értékű az együttható, illetve minél nagyobb ez a szám, annál kedvezőbb szétterülést jelez. Esetünkben a hatóanyag szétterülését tudjuk jellemezni a nagyméretű hordozó felületén. Az együttható, illetve fordított esete az alábbi képletekkel számolhatóak ki [18, 20]:

$$S_{12} = 4 \left[ \frac{\gamma_1^d \gamma_2^d}{\gamma_1^d + \gamma_2^d} + \frac{\gamma_1^p \gamma_2^p}{\gamma_1^p + \gamma_2^p} - \frac{\gamma_1}{2} \right]$$

$$S_{21} = 4 \left[ \frac{\gamma_1^d \gamma_2^d}{\gamma_1^d + \gamma_2^d} + \frac{\gamma_1^p \gamma_2^p}{\gamma_1^p + \gamma_2^p} - \frac{\gamma_2}{2} \right]$$

ahol  $\gamma^d$  a felületi szabadenergia diszperziós része, a  $\gamma^p$  a felületi szabadenergia poláris része és  $\gamma$  a teljes felületi szabadenergiája annak a komponensnek, amelynek szétterülését vizsgáljuk a másik komponensen.

#### *In vitro aerodinamikai vizsgálat*

Minták aerodinamikai paramétereinek (FPF, MMAD) meghatározására (részletezve 5. pontban) a Copley cég (Copley Scientific Ltd., Nottingham, Egyesült Királyság) által forgalmazott Andersen-féle kaszkádimpaktort (ACI, Andersen Cascade Impactor) (2. ábra) vettük igénybe. Ez a tüdőmodell a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben hivatalos („D” készülék). Az ACI nyolc különböző, lefelé haladva csökkenő pórúsátmérőjű szinttel rendelkezik és az azokon elhelyezkedő felfogótálákkal (2. ábra). Ezzel modellezve a tüdő egyre kisebb átmérőjű gene-



rációit. Az ACI-ban a vákuum-pumpa által generált, belégzést modellező levegő a készülékben szintenként nekiütközik a szinthez tartozó felfogótálcának. A tálcák és a készülék fala közti résen a levegő lentebb halad a soron levő szintre, minden szintlépés során a levegő 180-os fordulatot ír le [21, 22].

A kísérleteink során a mintákat speciális kemény zselatin kapszulába (transzparens, 3-as méret, Capsugel, Németország) mértük be [24]. A pulmonális hatóanyag bevitel esetén a farmakonok alacsonyabb dózisának alkalmazása elegendő az orális dózishoz képest, pontosabban egy tizedét alkalmazzák. Például szalbutamol esetén az orális dózis 2-4 mg felnőttek esetén, miközben az inhalációs dózis 200 µg [25]. Ebből adódóan a kapszulákba töltött mennyiségeket úgy határoztuk meg, hogy esetünkben termékenként a hatóanyagtartalom 10 mg [4] legyen. Ez a tömeg felel meg a ciprofloxacin orális dózis érték tizedének. Teszteléseink alkalmával Breezhaler® típusú inhalátort vettünk igénybe. Ebbe az eszközbe helyeztük a már megtöltött kapszulát, majd egy határozott mozdulattal a készülékbe épített tű segítségével lyukasztottuk ki azt. Így vált lehetővé a minta beinhaláltatása a tüdőmodellbe. A mérések alkalmával 60 l/perc-es áramlási sebességet és 4 másodperces belégzési időtartamot állítottunk be *in vitro* tüdődepozíciós vizsgálataink során. Minden egyes vizsgálat előtt az ACI felfogótálcáit felületaktív anyaggal vontuk be (Spam 80+ciklohexán oldat 1+99 tömegarányú elegyével), így lehetséges a többszöri beinhaláltatás a kaszkádimpaktorba anélkül, hogy a már a tálcákra előzetesen kitapadt részecskék lesodródjanak [26]. Az ACI szintjeire kitapadt por mennyiségek ismeretében Kaleida Graph kiértékelő program alkalmazásával határoztuk meg a számunkra fontos információt jelentő FPF és MMAD értékeket.

II. táblázat

Részecskeméret (medián) és a belőlük számolt  
sugár értékek

Vizsgált anyagok	D [0.5] (µm)	R (µm)
Kezeletlen Cip-HCl	10,51	5,26
Cip-HCl-szítált	5,09	2,54
Cip-HCl-spd	1,94	0,97
IH70	215,00	107,50
MgSt	6,92	3,46
IH70+MgSt	174,32	87,16

## 5. Eredmények értékelése

### Részecske méret, morfológia

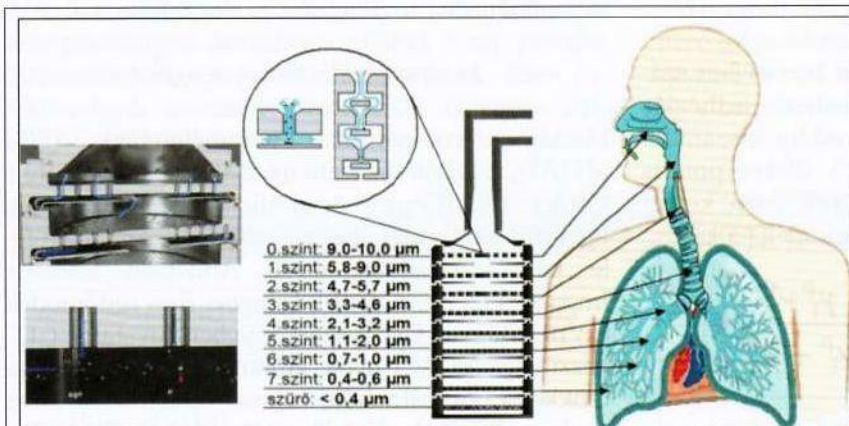
A szemcseméret analízis során D[0.5] (medián) érték meghatározása volt fontos számunkra, amely alapján értékelni tudtuk azt, hogy az alkalmazott kiindulási hatóanyagok és a porlasztva szárított minta inhalációs alkalmazásra megfelelő mérettartományban helyezkednek-e el. Továbbá D [0.5] érték feleként meghatároztuk az R (sugár) értékét a felhasznált anyagok vonatkozásában, amelynek ismeretére az adhéziós erő ( $F_{adh}$ ) kiszámításához elengedhetetlen.

A II. táblázatban feltüntetett eredmények alapján megállapítható, hogy a kezeletlen Cip-HCl, amelyből Cip-spd-t porlasztva szárítással készítettük nem felel meg az inhalációs terápia szempontjából ajánlott (~1-5 µm-es) mérettartománynak. A referenciaként vizsgált, szemcseméret optimalizálás céljából szítált hatóanyag (Cip-HCl-szítált) és a fejlesztés középpontjában álló minták alapjául szolgáló Cip-HCl-spd átlagos mérete már a követelményekhez igazodik. A szemcseméret-analízis is alátámasztja az IH 70 nagyméretű hordozó mivoltát.

A pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvé-

telek révén a kiindulási anyagok morfológiáját és habitusát tanulmányoztuk, a termékek vonatkozásában pedig a hatóanyag hordozó felületén való eloszlottságáról szereztünk ismereteket, illetve az egyedi részecskék szemcseméretéről is további információkat nyertünk.

A SEM felvételek (3. ábra) alapján megállapítható, hogy a kezeletlen Cip-HCl (A) esetén változatos alakú, egyenetlen felszínű kristályokról be-



2. ábra: Az ACI szintjei, mérettartományok és az áramlás szemléltetése [21, 23]





3. ábra: Kezeletlen Cip-HCl (A), Cip-HCl-spd (B) és IH70 (C) elektronmikroszkópos felvétele

szélhetünk, amelyek pulmonális alkalmazásra nem megfelelő méretűek. Ezzel szemben a Cip-HCl-spd (B) mélyedéseket tartalmazó, szférikus morfológiájú, homodiszperz minta. Az IH 70 (C) vonatkozásában nagyméretű, sima felszínű, hasáb alakú, közel romboéder formájú szemcséket látunk.

Elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk (4. ábra) annak céljából is, hogy tanulmányozzuk, milyen módon befolyásolja a magnézium-sztearát a hordozó felszínét és ezáltal a szerepét a formulálásban. Jelentős különbséget tapasztaltunk a porlasztva szárított, szférikus morfológiájú hatóanyag hordozóhoz kötődése kapcsán, mivel felületmódosítás nélkül (A) egyenletes eloszlást, míg felületkezelés estében (B) bizonyos mértékű hatóanyag koncentrációt tapasztaltunk.

Megállapítottuk, hogy a magnézium-sztearát a hordozó aktív helyeit betöltve módosította a hatóanyag hordozó felületén való elterülését és ezáltal feltételezhetően az interpartikuláris kölcsönhatásokat is befolyásolhatja. Véleményünk szerint hatással van a nagyméretű hordozó felületének porozítására is. Felületmódosítás nélkül (A) mikropórusos (pórusátmérő 1-10 µm), felü-

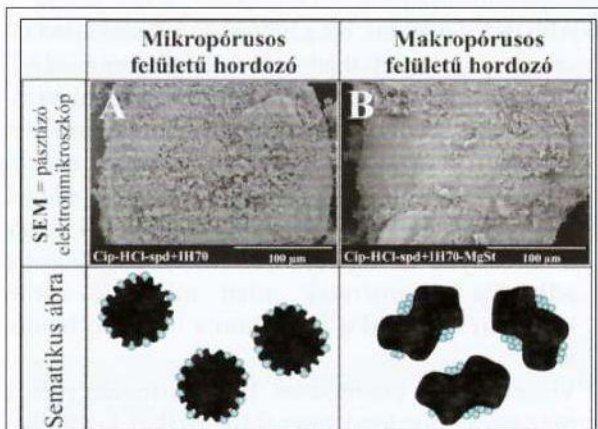
letkezelés esetén (B) makropórusos (pórusátmérő 10 µm feletti) az alkalmazott hordozó felülete. Ez is magyarázatul szolgál a tapasztalt eltérő hatóanyag elterülés jelenségre [1].

#### Szerkezeti vizsgálatok

A porröntgen (XRPD) és termoanalitikai (DSC) vizsgálatok elvégzésével a termékek előállításánál alkalmazott kezeletlen Cip-HCl és a porlasztva szárított hatóanyag (Cip-HCl-spd) szerkezetéről és kristályosságának állapotáról szereztünk hasznos információkat. Az alkalmazott hatóanyagok szerkezetének ismerete meghatározó lehet az aerodinamikai viselkedés, a hatáskifejtés, a segédanyaggal való kompatibilitás, a gyógyszerforma stabilitása szempontjából is.

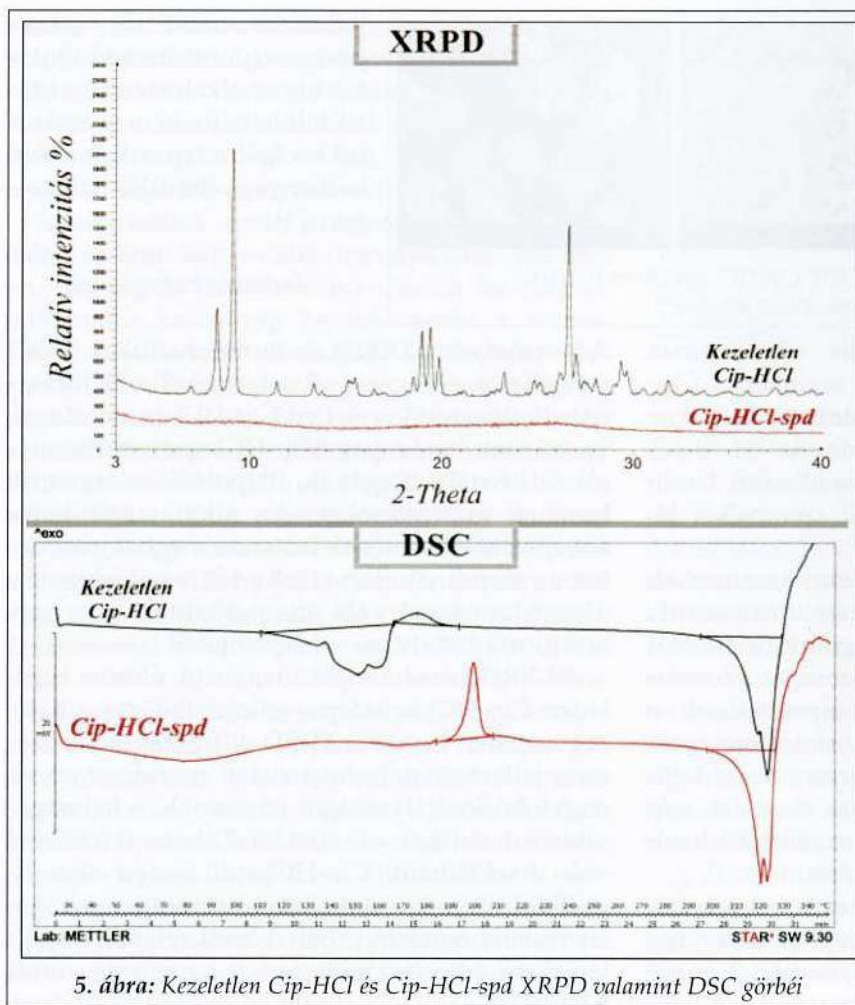
Az XRPD eredmények alapján (5. ábra) a kezeletlen Cip-HCl kristályos jellege alátámasztható. A kezeletlen Cip-HCl XRPD diffraktogramja számos jellemző csúcsintenzitást mutat, amelyek nagyfokú kristályosságot jelentenek, a legmagasabb intenzitású csúcs 9,09 2-theta értékeknél volt detektálható. Cip-HCl-spd esetén nem figyelhetünk meg csúcsokat a porröntgen vizsgálat vonatkozásában, amely következtében megállapítható a porlasztva szárított hatóanyag amorf jellege.

A DSC görbék (5. ábra) tanulmányozása alapján elmondható, hogy a kezeletlen Cip-HCl esetében részleges amorf sajátság figyelhető meg. Először átkristályosodást látunk a termoanalitikai görbén, majd 322,68 °C-nál olvadáspontot detektáltunk, amelyet endoterm csúcs jelez. Ez megfelel a ciprofloxacin-hidroklorid szakirodalomban dokumentált olvadáspontjának [27]. A teljesen amorf anyagoknál nem olvadáspontról, hanem üvegesedési hőmérsékletéről beszélhetünk, amely egy elnyújtott hőmérsékleti tartomány, amelyen belül az anyag ellágyul. Cip-HCl-spd esetén a DSC görbén az amorf sajátságnak megfelelően hő hatására lágyulást tapasztaltunk, majd az amorf forma rekristallizálódott 200,63 °C-nál és ennek az újrakristályosodott formának az olvadáspontját detektáltuk 320,24 °C-nál. Az amorfizálás jelensége a porlasztva szárításból adódik. Tehát az XRPD és DSC vizsgálatok során tapasztaltak egyértelműen alátámasztják a kezeletlen Cip-HCl kristályos, esetleg részlegesen amorf és a Cip-HCl-spd amorf jellegét.



4. ábra: Cip-HCl-spd+IH 70 (A) és Cip-HCl-spd+(IH70+MgSt) (B) elektronmikroszkópos felvétele, illetve a hordozó felületi porozitásának és a hatóanyag hordozón való elterülésének sematikus ábrája





5. ábra: Kezeletlen Cip-HCl és Cip-HCl-spd XRPD valamint DSC görbái

Nedvesedési peremszög meghatározása és a belőle számolt összefüggések

A 4. pontban részletezett eljárással detektáltuk az alapanyagok nedvesedési peremszögeit (III. táblázat) desztillált víz és dijódmétán felhasználása esetén is. A kapott értékekből a már korábban ismertett összefüggésekkel meghatároztuk az anyagok felületi szabadenergiájának ( $\gamma_s$ ) diszperziós ( $\gamma_s^d$ ) és poláris részét ( $\gamma_s^p$ ). Összegükből pedig kifejeztük a felületi szabadenergiájukat ( $\gamma_s$ ). Ezekből az értékekből kiszámoltuk az anyagokra jellemző polaritást és az azonos anyagi minőséggel rendelkező szemcsék között értelmezhető kohéziós munkát ( $W_c$ ). A III. táblázat alapján elmondható, hogy a legnagyobb polaritási értékeket a kristályos Cip-HCl-szitált hatóanyag esetén kaptuk. A magnézium-sztearáttal turbulázott hordozó vonatkozásában pedig csökkent a minta polaritása. A kohéziós munkák ( $W_c$ ) eredményeinek ismeretében kijelenthető, hogy Cip-HCl-spd esetén ezen érték nagyságrendileg meggyezik a kiindulási kristályos formáival, valame-

lyest csökkent értéket kaptunk. Magnézium-sztearát esetén kapott alacsony polaritási érték alátámasztja, hogy magas páratartalom esetén tényleg javíthatja a DPI készítmény nedvességgel szembeni ellenállását, ezáltal stabilitását is.

A 4. pontban leírtak alapján meghatároztuk a turbulázott termékek esetén fellépő adhéziós munkát és erőt, illetve a rájuk jellemző szétterülési együtthatót (IV. táblázat). Azt látjuk, hogy a porlasztva szárított farmakont (Cip-HCl-spd) tartalmazó termékeknél jelentkező adhéziós erő számottevően kisebb, megközelítőleg harmada, mint a szemcseméret optimalizálás céljából szitált, kristályos ciprofloxacín-hidrokloridot (Cip-HCl-szitált) tartalmazó minták esetén. Megállapítható, hogy a magnézium-sztearát (MgSt) csökkentette az adhéziós munkát és erőt (antiadhezív segédanyag). Továbbá a negatív számértékből adódóan a hatóanyag

szétterülését a hordozó felületén kedvezőtlenebbé teszi, amelyet a Cip-HCl-spd+ (IH70+MgSt) elektronmikroszkópos felvétele is alátámasztott már.

Az eddig ismertett adatok alapján az alábbi következtetések vonhatóak le:

- Abban az esetben, ha a hatóanyag összetapadásra is hajlamos, tehát jelentős kohéziós munka jellemzi, de az adhéziós értékei hordozóval vizsgálva viszonylag alacsonyak, javasolt lehet ilyen sajátosságú farmakon (pl. Cip-HCl-spd) esetén hordozó alkalmazása az inhalációs terápiában. Úgy véljük ilyen esetben a hordozó segíti, hogy a hatóanyag ne tapadjon össze, de az alacsony adhéziós paraméterek miatt inhaláció során könnyen leszakad a farmakon a hordozó felületéről.
- Viszont ezzel ellentétben, ha az adhézió erős a hatóanyag-hordozó interaktív fizikai keverékében, akkor a hordozóra rátapad erősen a hatóanyag, így alapvetően nem segíthet hordozó alkalmazása magas kohezív sajátosságok esetén sem (Cip-HCl-szitált).



III. táblázat

Nedvesedési peremszög desztillált víz és diódmetán esetén, felületi szabadenergia és komponensei, illetve polaritás és kohéziós munka

Minták	$\Theta_{\text{viz}} [^\circ]$	$\Theta_{\text{diódmetán}} [^\circ]$	$(\gamma_s^d) [mN/m]$	$(\gamma_s^p) [mN/m]$	$(\gamma_s) [mN/m]$	Polaritás [%]	Wc [mN/m]
Cip-HCl-szitált	10,70	14,40	44,37	36,43	80,80	45,09	161,6
Cip-HCl-spd	54,20	29,00	40,44	20,09	60,53	33,19	121,06
IH70	3,30	6,00	45,58	36,88	82,46	44,72	164,92
IH70+MgSt	64,60	62,00	26,07	19,22	45,29	42,44	-
MgSt	102,63	68,64	24,33	2,64	26,96	9,79	53,92

IV. táblázat

Turbulázott termékeinkben fellépő adhéziós munka és adhéziós erő, valamint a szétterülési együttható

Termékek	$W_a [mN/m]$	$F_{adh} [mN]$	$S_{21}$
Cip-HCl-szitált+IH70	108,26	$1,690 \cdot 10^{-3}$	1,64
Cip-HCl-szitált+(IH70+MgSt)	78,27	$1,216 \cdot 10^{-3}$	-45,59
Cip-HCl-spd+IH70	98,72	$0,596 \cdot 10^{-3}$	16,67
Cip-HCl-spd+(IH70+MgSt)	73,23	$0,440 \cdot 10^{-3}$	-18,36

#### In vitro aerodinamikai vizsgálat

- Magnézium-sztearátot tartalmazó minta esetén csökkent a polaritás, az adhéziós munka és az adhéziós erő is, a szétterülés kedvezőtlenebbé vált. Ebből arra következtetünk, hogy az interpartikuláris kölcsönhatások módosultak, a hatóanyag könnyebben leválhat a hordozó felszínéről inhaláció során és javul a nedvességgel szembeni ellenállása a készítménynek.

Ezek alapján az *in vitro* tüdődepozíció során az alábbiakat várjuk:

- A porlasztva szárított hatóanyag (Cip-HCl-spd) esetében a jelentős kohéziós munka mellett alacsony adhéziós tulajdonság figyelhető meg, így hordozó alkalmazása javíthatja a tüdődepozíciót.
- A szemcseméret optimalizálás céljából szitált, kristályos ciprofloxacín-hidrokloridot (Cip-HCl-szitált) a porlasztott hatóanyaghoz (Cip-HCl-spd) képest magasabb kohéziós tulajdonság jellemzi, sőt az adhéziós értékei is jóval magasabbak, (ezáltal a hatóanyag szemcsék összetapadása is jelentős, viszont a hordozó és a hatóanyag között szintén erős a kölcsönhatás), így a hordozó alkalmazása nem segítheti elő a tüdődepozíciós eredmények javulását.
- Magnézium-sztearát igénybe vétele a formulálás során pedig várhatóan további tüdődepozíciós javulást eredményez.

Az Andersen-féle kaszkádimpaktor segítségével tanulmányoztuk a minták aerodinamikai viselkedését a következő paraméterek (FPF, fine particle fraction és MMAD, mass median aerodynamic diameter) meghatározásával. A tálcákon kitapadt hatóanyag mennyiségének ismeretében (UV-VIS spektroszkópia) Kaleida Graph kiértékelő program alkalmazásával számítottuk ki a paramétereket. A finom részecske frakció (FPF) a kaszkádimpaktor 2-5. szintjein kitapadt (1,1-5,7  $\mu\text{m}$ -es) szemcsék százalékos összetételét fejezi ki, ez a szemcseméret tartomány az ideális tüdődepozíció vonatkozásában. Az MMAD a részecskék valós-, belégzés során kialakuló átlagos aerodinamikai átmérője. Az emittált dózis (ED) az inhaláció során a kapszulából felszabaduló hatóanyag mennyige, százalékban kifejezve. Ezt úgy határoztuk meg, hogy a minták kapszulába bemérésekor feljegyeztük a kapszulák üres és töltött tömegét, majd az Andersen-féle kaszkádimpaktoros kísérletet elvégezve a kapszulákat visszamértük. A kiszámolt eredményeket az alábbi táblázatban tüntettük fel:

Az aerodinamikai vizsgálatok eredményei alapján (V. táblázat) a következő megállapításokat fogalmaztuk meg:

- A tüdődepozíció (FPF) vonatkozásában Cip-HCl-spd esetén hordozó alkalmazásával javulást értünk el. Ez

V. táblázat

FPF, MMAD és ED értékek

Vizsgált minták	FPF (%)	MMAD ( $\mu\text{m}$ )	ED (%)
Cip-HCl-szitált	32,19	6,93	99,38
Cip-HCl-szitált+IH70	33,00	5,66	99,99
Cip-HCl-szitált+(IH70+MgSt)	32,87	4,91	99,75
Cip-HCl-spd	58,96	3,47	97,39
Cip-HCl-spd+IH70	62,42	3,23	99,87
Cip-HCl-spd+(IH70+MgSt)	74,40	2,45	99,41



zel ellentétben a Cip-HCl-szítált esetén a hordozó jelenléte nem eredményezett előrelépést. Cip-HCl-spd esetén a magnézium-sztearátot tartalmazó mintánál további jelentős FPF érték javulás látható.

- Az átlagos aerodinamikai átmérő (MMAD) vonatkozásában leszögezhető, hogy fordított arányosság figyelhető meg a szemcsék mérete és a depozíció hatékonysága között.
- Az emittált dózis (ED) tekintetében látjuk, hogy a hordozó alapú rendszerek esetében inhaláció során kevesebb hatóanyag maradt a kapszulában.
- A fizikai-kémiai vizsgálatok alapján tett következtetések és általuk a tüdődepozíció során várt tendenciák, eredmények beigazolódtak az Andersen-féle kaszkád-impaktor mérési eredményei alapján.

## 6. Összefoglalás, jövőkép

Célkitűzéseinknek megfelelően hordozó alapú DPI formulációkat állítottunk elő és vizsgáltunk irodalmi adatok és a kutatócsoport eddigi tapasztalatai alapján adott előállítási paraméterek alkalmazásával. Különbséget tapasztaltunk a hatóanyag szemcsék méretében és morfológiájában szítált, mikronizált és porlasztva szárított farmakon vonatkozásában. Magnézium-sztearáttal felületkezelést végeztünk, amely befolyásolta a hatóanyag hordozón való eloszlását, ezáltal az interpartikuláris kölcsönhatásokat és javította a tüdődepozíciós eredményeket is. Innovatív technológiának köszönhetően – azaz porlasztva szárított hatóanyag alkalmazása hordozó felületén – sikerült figyelemre méltó tüdődepozíciós eredményt (~FPF 75 %) elérnünk, amely messze túlszárnyalja a gyári készítményekét (~FPF 20-30 %) és felveheti a versenyt az új generációs DPI készítményekkel. Sőt interpartikuláris kölcsönhatások vizsgálata révén összefüggést találtunk az interaktív fizikai keverékek fizikai-kémiai tulajdonságai és tüdődepozíciós eredményei között. Tervezzük a szemléltetésre került készítmények stabilitási és *in silico* tüdőmodellezési vizsgálatait.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-16-2-I. kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült. A munka a Bolyai János kutatói ösztöndíj (2014-2017) támogatásával valósult meg.

## IRODALOM

1. Benke, E., Szabóné Révész, P., Ambrus, R.: Acta Pharm Hung, 87, (2017).
2. Healy, A. M., Amaro, M. I., Paluch, K. J., Tajber, L.: Adv Drug Deliver Rev, 75, 32–52 (2014).
3. Benke, E., Chvatal, A., Szabó-Révész, P., Ambrus, R.: Formulation of lactose-based dry powder inhalers by surface treatment containing different habit of active agent. 2<sup>nd</sup> European Conference on Pharmaceutics (2017).
4. Keyhaneh, K., Pallagi, E., Szabó-Révész, P., Csóka, I., Ambrus, R.: Drug Design, Development and Therapy, 10, 3331–3343 (2016).
5. Stass, H., Baumann-Noss, S., Delesen, H., Nagelschmitz, J., Willmann, S., Edginton, A.: Ciprofloxacin PulmoSphere® Inhalational Powder: a healthy volunteer study. American Thoracic Society International Conference (2008).
6. Pilcer, G., Wauthoz, N., Amighi, K.: Adv Drug Deliver Rev, 64(3), 233–256 (2012).
7. <https://www.meggle-pharma.com/en/lactose/20-inhalac-70.html> [2017.05.06.]
8. Palistra, M.: The influence of Magnesium Stearate and carrier surface on the deposition performance of carrier based Dry Powder Inhaler formulations. (2008).
9. Islam, N., Rashid, A., Camm, G.: Effects of magnesium stearate on the efficient dispersion of salbutamol sulphate from carrier-based dry powder inhaler formulations. Respiratory Drug Delivery (RDD) EUROPE, (2011).
10. da Silva Andrade, F. R.: Self-assembled polymeric micelles as powders for pulmonary administration of insulin. (2015).
11. <https://www.pharmindex-online.hu/gyogyszerkereso> [2017.05.06.]
12. <https://www.ogyei.gov.hu/gyogyszeradatbazis/> [2017.05.06.]
13. Chvatal, A., Benke, E., Szabóné Révész, P., Ambrus, R.: Gyógyszerészet, 60, 197–206 (2016).
14. [https://www.researchgate.net/publication/284045495\\_Insulin\\_spray-dried\\_powder\\_and\\_smoothed\\_lactose\\_a\\_new\\_formulation\\_strategy\\_for\\_nasal\\_and\\_pulmonary\\_delivery](https://www.researchgate.net/publication/284045495_Insulin_spray-dried_powder_and_smoothed_lactose_a_new_formulation_strategy_for_nasal_and_pulmonary_delivery) [2017.05.06.]
15. U.S. Pat. 2012/0082727 A1 (2012).
16. Hazare, S., Menon, M.: Indian J Pharm Sci, 725–727 (2009).
17. Palistra, M.: The influence of Magnesium Stearate and carrier surface on the deposition performance of carrier based Dry Powder Inhaler formulations. (2008).
18. Farkas B., Révész P.: Kristályosítástól a tablettázásig. UNIVERSITAS SZEGED KIADÓ, Szeged, 2007.
19. Schuster, J. M., Schvezov, C. E., Rosenberger, M. R.: Procedia Materials Science, 8, 732–741 (2015).
20. Tüske, Zs.: Influence of the surface free energy on the parameters of pellets. (2005).
21. Pomázi, A., Chvatal, A., Ambrus, R., Szabóné Révész, P.: Gyógyszerészet, 58, 131–139 (2014).
22. Wong, W., Crapper, J., Chan, H.-K., Traini, D., Young, P. M.: J Pharm Biomed Anal, 51(4), 853–857 (2010).
23. <https://vimeo.com/178587849> [2017.05.06.]
24. <http://www.capsugel.com/ihc/dry-powder-inhaler-capsules> [2017.05.06.]
25. Boarder, M., Newby, D., Navty, P.: 'Pharmacology for Pharmacy and the Health Sciences: a patient-centred approach', Oxford University Press, 1st ed., p273., (2010).
26. Pomázi, A., Ambrus, R., Szabóné Révész, P.: Acta Pharm Hung, 84, 55–62 (2014).
27. <https://www.scbt.com/scbt/product/ciprofloxacin-hcl-93107-08-5> [2017.05.06.]